



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 28 692.5

Anmeldetag: 09. Juni 2000

Anmelder/Inhaber: Micronas GmbH,
Freiburg im Breisgau/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Untersuchung von
membranumschlossenen Biokom-
partimenten

IPC: G 01 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Micronas GmbH
Hans-Bunte-Straße 19
79108 Freiburg

Dreikönigstraße 13
D-79102 Freiburg i. Br.

Telefon (07 61) 79 174 0
Telefax (07 61) 79 174 30

Unsere Akte • Bitte stets angeben

P 00 340 H

Hu/be

Verfahren zur Untersuchung von membranumschlossenen Biokompartimenten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von membranumschlossenen Biokompartimenten, wobei die Biokompartimente in einer Mikrofließkammer bereitgestellt werden, die von einem mit den Biokompartimenten in Kontakt stehenden, gegebenenfalls einen die Biokompartimente beeinflussenden Wirkstoff enthaltenden Kulturmedium durchflossen wird, und wobei der pH-Wert des in der Mikrofließkammer befindlichen Kulturmediums gemessen wird. Dabei können die Biokompartimente beispielsweise biologische Zellen, Mikroorganismen (Pilze, Bakterien), biochemische Kompartimente und/oder Mitochondrien umfassen.

Aus EP 0 394 406 B1 kennt man bereits ein Verfahren der eingangs genannten Art, bei dem lebende biologische Zellen in einer von einem Kulturmedium durchflossenen Mikrofließkammer angeordnet werden, die an ihrem Boden einen Silizium-Sensor aufweist. In der Mikrofließkammer ist eine Referenzelektrode vorgesehen, die mit dem Kulturmedium in Kontakt steht. Bei dem vorbekannten Verfahren wird in einem ersten Verfahrensschritt der Durchfluß des Kulturmediums in der Mikrofließkammer gestoppt. Dann wird die pH-Wertänderung, als metabolischer Stoffwechselindikator in dem in der Mikrofließkammer befindlichen Kulturmedium durch Messung des elektrischen Potentials zwischen

dem Silizium-Sensor und der Referenzelektrode gemessen. Mit dem Verfahren läßt sich z.B. die Wirkung eines in dem Kulturmedium enthaltenen zellbeeinflussenden Wirkstoffs auf den Stoffwechsel der Zellen messen. Ungünstig ist dabei jedoch, daß das Verfahren
5 nur eine Aussage über die Ausscheidung saurer Stoffwechselprodukte in Form einer pH-Wertänderung in dem Kulturmedium ermöglicht, während andere, durch den Stoffwechsel der Zellen verursachte Veränderungen nicht berücksichtigt werden.

10 Aus DE 44 17 078 A1 kennt man auch bereits ein Verfahren, bei dem in einer Mikrofließkammer befindliche biologische Zellen mittels mehrerer unterschiedlicher Mikrosensoren gleichzeitig untersucht werden. Dabei wird zusätzlich zu der Ansäuerung gleichzeitig
15 auch noch die Atmung der Zellen in dem Kulturmedium überwacht, was eine genauere Untersuchung der Wirkung eines in dem Kulturmedium enthaltenen Wirkstoffs auf die Zellen ermöglicht. Das Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die Meßwerte für pH-Wert und Sauerstoffgehalt an unterschiedlichen Stellen und somit an
20 unterschiedlichen, in der Mikrofließkammer befindlichen biologischen Zellen gemessen werden. Zellkulturen, Zellschnitte, Gewebe und dergleichen zu untersuchendes biologisches Material sind jedoch oft heterogen, d.h. unterschiedliche Zellen können unterschiedliche Signale abgeben. Bei dem vorbekannten Verfahren kann es deshalb
25 zu Ungenauigkeiten bei der Untersuchung eines in dem Kulturmedium enthaltenen Wirkstoffs kommen, wenn der pH-Wert und/oder der Sauerstoffgehalt an den Meßorten der Sensoren für pH-Wert und Sauerstoffgehalt voneinander abweichen.

30 Es besteht deshalb die Aufgabe, ein Verfahren zur Untersuchung von membranumschlossenen Biokompartimenten anzugeben, das es ermöglicht, an einem Ort mehrere Stoffwechselparameter der Biokompartimente zu messen.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht insbesondere darin,

35 a) daß die Konzentration eines von den Biokompartimenten beim

Stoffwechsel abgebbaren und/oder aufnehmbaren Stoffes in einem im Wirkungsbereich der Biokompartimente befindlichen Teilbereich des Kulturmediums indirekt gemessen wird, indem zwischen einer in dem Teilbereich angeordneten Arbeitselektrode und einer dazubeabstandeten Referenzelektrode eine elektrische Spannung derart an das Kulturmedium angelegt wird, daß aus dem in dem Kulturmedium befindlichen Stoff Hydroxid- oder Wasserstoff-Ionen gebildet werden,

- b) daß an einer in dem Teilbereich des Kulturmediums befindlichen Meßstelle während des Anliegens dieser elektrischen Spannung wenigstens ein erster Meßwert für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen wird,
- c) daß anschließend die elektrische Spannung abgeschaltet oder derart geändert wird, daß die Bildung von Hydroxid- und Wasserstoff-Ionen aus dem Stoff aufhört,
- d) daß kurz vor oder nach der Messung des ersten Meßwertes bei abgeschalteter elektrischer Spannung oder bei einer Spannung, bei der die Bildung von Hydroxid- und Wasserstoff-Ionen aus dem Stoff unterbleibt, zumindest ein zweiter Meßwert für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen wird,
- e) daß aus dem ersten und zweiten Meßwert die Differenz gebildet wird,
- f) daß die Schritte a) bis e) wenigstens einmal wiederholt werden,
- g) daß aus dem Unterschied zwischen wenigstens zwei dieser Meßwert-Differenzen die Konzentrationsänderung des Stoffs in dem Kulturmedium und aus dem Unterschied zwischen wenigstens zwei der ersten pH-Meßwerte oder zweiten pH-Meßwerte die Ansäuerung oder Basifizierung des Kulturmediums ermittelt werden
- h) und daß aus den so gewonnen Meßwerten für die Konzentrationsänderung und die Ansäuerung oder Basifizierung die Stoffwechselaktivität der Biokompartimente bestimmt wird.

Das Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß die Biokompartimente den pH-Wert des Kulturmediums kontinuierlich mit etwa konstanter

Steigung verändern und daß diese pH-Wert-Änderung wesentlich langsamer verläuft, als die während des Anlegens der elektrischen Spannung zur Bildung von Hydroxid-Ionen (OH^- -Ionen) oder Wasserstoff-Ionen (H^+ -Ionen) aus dem in dem Kulturmedium enthaltenen, beim Stoffwechsel von den Biokompartimenten abgebbaren und/oder aufnehmbaren Stoff bewirkte pH-Wert-Änderung. In vorteilhafter Weise ist es dadurch möglich, trotz der Überlagerung der von den Biokompartimenten in das Kulturmedium abgegebenen oder aus diesen aufgenommenen Hydroxid- und/oder Wasserstoffionen mit den aus den in dem Kulturmedium enthaltenen Stoff gebildeten Hydroxid- und/oder Wasserstoffionen an ein und derselben Meßstelle und mit nur einem einzigen pH-Sensor sowohl die durch die Biokompartimenten bewirkte Konzentrationsänderung des von den Biokompartimenten abgebbaren und/oder aufnehmbaren Stoffs als auch die durch die Biokompartimente bewirkte pH-Wert-Änderung in dem Kulturmedium zu messen. Mit dem Verfahren können insbesondere die Atmung der Biokompartimente durch Messung der Sauerstoffkonzentrationsänderung sowie die Konzentrationsänderung von Stickstoffmonoxid (NO), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und/oder andere Sauerstoff und/oder Wasserstoff in chemisch gebundener Form enthaltende Stoffe, wie z.B. auch sich an der Zelloberfläche befindende Moleküle, gemessen werden. Eine durch Unterschiede der einzelnen Zellen der Zellkultur bewirkte Ortsabhängigkeit der Konzentrationsänderung und/oder der pH-Wertänderung wirkt sich daher auf die Genauigkeit der Bestimmung des Stoffwechsels der zu untersuchenden Zellen praktisch nicht aus.

Aus Sohn, B.-H., Kim, C.-S., "A new pH-ISFET based dissolved oxygen sensor by employing electrolysis of oxygen" in Sensors and Actuators B34 (1996), Seite 435-440 ist zwar bereits ein gattungsfremdes Verfahren bekannt, bei dem der Sauerstoffgehalt in einem Analyten indirekt über den pH-Wert gemessen wird, wobei an dem Analyten das elektrische Potential soweit in den negativen Bereich abgesenkt wird, daß aus dem in dem Analyten befindlichen Sauerstoff Hydroxid-Ionen gebildet werden, und wobei diese Hydroxid-Ionen mittels eines ionenselektiven Sensors detektiert werden. Der Analyt enthält

jedoch keine Biokompartimente, die während der Messung z.B. durch saure Stoffwechselprodukte und Sauerstoffaufnahme den Analyten verändern. Auch erfolgt bei dem vorbekannten Verfahren keine Auswertung des Sensorsignals hinsichtlich der Bestimmung der Atmungsaktivität und der Ansäuerung bei nicht abgesenktem elektrischen Potential.

Bei einer besonders vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens ist vorgesehen, daß die Abfolge bestehend aus den Schritten a) bis g) wenigstens zweimal durchlaufen wird und daß bei diesen Durchläufen die Polarität der zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode angelegten elektrischen Spannung unterschiedlich gewählt wird. Dadurch ist es möglich, mit nur einem pH-Wertsensor sowohl die Konzentrationsänderung von elektronegativen Stoffen, wie z.B. Sauerstoff, als auch die Konzentration von elektropositiven Stoffen, wie z.B. Stickstoffmonoxid oder Wasserstoffperoxid, in dem Kulturmedium zu messen. Dabei wird zur Messung der Konzentrationsänderung eines elektronegativen Stoffs ein gegenüber dem Potential der Referenzelektrode negatives elektrisches Potential an der Bezugselektrode angelegt, während das Bezugselektrodenpotential zur Messung der Konzentrationsänderung eines elektropositiven Stoffs positiv gewählt wird.

Vorteilhaft ist, wenn die Zeitpunkte für die Messung der pH-Meßwerte so auf die Zeitpunkte, an denen das elektrische Potential verändert oder abgeschaltet wird, abgestimmt werden, daß sich die Wasserstoff- und Hydroxid-Ionenkonzentration in dem Kulturmedium zu den Meßzeitpunkten im wesentlichen im Gleichgewicht befindet. Der Stoffwechsel bzw. die Vitalität der Biokompartimente kann dadurch mit großer Präzision gemessen werden.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß jeweils der Zeitabstand zwischen dem Zeitpunkt des Anlegens, Abschaltens oder Veränderns der elektrischen Spannung und dem darauffolgenden Zeitpunkt, in dem ein pH-Meßwert gemessen wird,

bei allen pH-Meßwerten etwa gleich ist. Dabei wird durch die Bildung der Differenz aus den ersten und zweiten pH-Meßwerten bei der Messung der Konzentrationsänderung des am Stoffwechsel der Biokompartimente beteiligten Stoffs in dem Kulturmedium beziehungsweise aus den ersten pH-Meßwerten bei der Messung der durch die Biokompartimente verursachten pH-Wertänderung des Kulturmediums der Einfluß, den der zeitliche Abstand zwischen dem Zeitpunkt des Beginns einer Potentialveränderung und der darauffolgenden Messung des pH-Meßwertes hat, kompensiert. Somit ergibt sich eine noch größere Meßgenauigkeit.

Besonders vorteilhaft ist, wenn die elektrische Spannung abgeschaltet oder gemäß Schritt c) geändert wird, bevor sich ein Gleichgewichtszustand der Wasserstoff- und Hydroxid-Ionenkonzentration in dem Kulturmedium ausgebildet hat. Die in der Mikrofließkammer befindlichen Biokompartimente werden dann jeweils nur kurz mit dem zur Bildung der Hydroxid oder Wasserstoffionen geeigneten elektrischen Potential beaufschlagt und bleiben somit durch das Anlegen des Potentials in ihrem physiologischen Zustand weitgehend unbeeinflusst. Dadurch ist es möglich, über einen längeren Zeitraum Messungen an den Biokompartimenten durchzuführen, beispielsweise um mehrere unterschiedliche Wirkstoffe nacheinander mit den Biokompartimenten in Berührung zu bringen und deren Wirkung auf die Biokompartimente miteinander zu vergleichen.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens wird der zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode fließende elektrische Elektrodenstrom gemessen. Der Verlauf des Elektrodenstroms kann dann mit dem Verlauf der an die Elektroden angelegten elektrischen Spannung und ggf. einer zuvor abgespeicherten Strom-Spannungskennlinie oder einer -kennlinienschar verglichen werden, um die Plausibilität der Meßergebnisse zu überprüfen.

Zweckmäßigerweise werden die Biokompartimente derart an der Arbeitselektrode angelagert, daß sie diese zumindest bereichsweise

überdecken. Aus den zeitlichen Verläufen der zwischen Arbeitselektrode und Bezugselektrode anliegenden elektrischen Spannung und dem Elektrodenstrom kann dann eine eventuelle Veränderung der Morphologie oder Adhäsion der Biokompartimente bestimmt werden.

5 Besonders vorteilhaft ist, wenn die pH-Meßwerte mittels eines ionenselektiven Feldeffekttransistors (ISFET) gemessen werden. Das Verfahren ermöglicht dann wegen der kleinen Abmessungen eines solchen
10 Sensors eine hohe Ortsauflösung, wobei es sogar möglich ist, einzelne Zellen der Zellkultur zu untersuchen und die dabei erhaltenen Meßwerte miteinander zu vergleichen. Auf diese Weise können beispielsweise in einer Zellkultur einzelne Zellen, die auf einen bestimmten Wirkstoff besonders empfindlich reagieren, lokalisiert werden.

15 Bei einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung wird der Durchfluß des Kulturmediums während und zwischen der Erfassung des ersten und letzten pH-Meßwertes einer zur Bestimmung der Atmungsaktivität der Biokompartimente und der durch die
20 Biokompartimente bewirkten pH-Wertänderung des Kulturmediums vorgesehenen pH-Wert-Messreihe angehalten oder zumindest reduziert. Der Sauerstoffgehalt nimmt dann nach dem Anhalten oder Reduzieren des Kulturmedium-Durchflusses bei Sauerstoff aufnehmenden Biokompartimenten ab und bei durch Photosynthese Sauerstoff
25 produzierenden Biokompartimenten zu. Somit ergibt sich jeweils ein entsprechend großes Meßsignal, was eine genaue Bestimmung der Atmungsaktivität der Biokompartimente ermöglicht. Bei Biokompartimenten, die Sauerstoff aufnehmen, kann nach dem Anhalten oder Reduzieren des Kulturmedium-Durchflusses eine Zunahme des pH-Wertes
30 des Kulturmediums und bei Biokompartimenten, die Sauerstoff produzieren, eine Abnahme des pH-Wertes beobachtet werden. Somit ergibt sich auch bei der durch die Biokompartimente bewirkten pH-Wert-Änderung des Kulturmediums ein entsprechend großes Meßsignal.

35 Nachfolgend sind Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der

Zeichnung näher erläutert. Es zeigen zum Teil stärker schematisiert:

- Fig. 1 einen Längsschnitt durch eine Vorrichtung mit einer
 5 Mikrofließkammer zur Untersuchung von lebenden, membran-
 umschlossenen Biokompartimenten,
- Fig. 2 einen Längsschnitt durch einen in den Boden der Mikro-
 10 fließkammer eingelassenen ISFET mit einer benachbart dazu
 angeordneten Elektrode, wobei an dem ISFET und der
 Elektrode biologische Zellen adhärent angelagert sind,
- Fig. 3 eine Aufsicht auf die in Fig. 2 gezeigte Anordnung,
- Fig. 4 eine graphische Darstellung eines mittels eines ISFETs
 15 gemessenen Meßsignales, wobei der Meßsignalverlauf nur
 schematisch dargestellt ist,
- Fig. 5 eine graphische Darstellung eines mittels eines ISFETs
 20 in der Mikrofließkammer gemessenen Meßsignales, wobei
 auf der Abszisse die Zeit und auf der Ordinate der pH-Wert
 aufgetragen ist und wobei das in der Mikrofließkammer
 befindliche Zell-Kulturmedium weitestgehend frei von
 zellbeeinflussenden Wirkstoffen ist,
- Fig. 6 eine Darstellung ähnlich Fig. 5, wobei jedoch in dem Zell-
 25 Kulturmedium Jodacetat als zellbeeinflussender Wirkstoff
 enthalten ist,
- Fig. 7 eine Darstellung ähnlich Fig. 5, wobei jedoch in dem Zell-
 30 Kulturmedium Triton® enthalten ist und
- Fig. 8 eine Darstellung ähnlich Fig. 4, wobei jedoch bei jedem
 Anlegen einer elektrischen Spannung an das Kulturmedium
 die Polarität der Spannung verändert wird.

Bei einem Verfahren zur Untersuchung von membranumschlossenen Biokompartimenten werden als biologische Zellen ausgebildete Biokompartimente 1 in einer Mikrofließkammer angeordnet. Die Mikrofließkammer 2 weist eine von einem Kammergehäuse umgrenzte Meßkammer 3 mit einer Einlaßöffnung 4 und einer Auslaßöffnung 5 für ein Nähr- oder Kulturmedium auf. Das Kammergehäuse hat ein Kammerunterteil 6 und ein dazu passendes Deckelteil 7, die durch einen dazwischen befindlichen Dichtring 8 flüssigkeitsdicht miteinander verbunden sind.

Die Einlaßöffnung 4 der Meßkammer 3 ist über einen Zuführkanal 9 mit einem Kulturmedium-Vorrat 10 verbunden. In dem Zuführkanal 9 ist eine Pumpe 11 zum Fördern des Kulturmediums angeordnet. Die Pumpe 11 ist mittels einer in der Zeichnung nicht dargestellten Steuereinrichtung ein- und ausschaltbar. Die Auslaßöffnung 5 der Mikrofließkammer 2 ist über eine Ableitung 12 an einer Austrittsöffnung 13 für das Kulturmedium angeschlossen. In der Meßkammer 3 stehen die Biokompartimente 1 mit dem Kulturmedium in Berührung.

Im Boden der Meßkammer 3 sind mehrere ionenselektive Feldeffekttransistoren (ISFETs) 14 angeordnet. Wie in Fig. 2 erkennbar ist, weisen die ISFETs ein aus einem Halbleitermaterial bestehendes Substrat 15 auf, in das für Drain 16 und Source 17 hochdotierte Zonen mit zum Substrat 15 entgegengesetzten Leitungstyp angeordnet sind. Zwischen Drain 16 und Source 17 ist das Gate 18 angeordnet. Gate 18, Drain 16 und Source 17 sind über eine darüber befindliche, in der Zeichnung nicht näher dargestellte Silizium-Nitrid-Schicht gegen die Meßkammer 3 elektrisch isoliert. Die Silizium-Nitrid-Schicht bildet an ihrer dem Gate 18 abgewandten Außenseite eine aktive Sensorschicht, über die der ISFET 14 mittels dort in dem Kulturmedium befindlicher Wasserstoff-Ionen steuerbar ist. Gate 18, Drain 16 und Source 17 der ISFETs 14 sind mit einer an sich bekannten Auswerteeinrichtung zur Messung des zu dem Meßsignal des jeweiligen ISFETs 14 etwa proportionalen pH-Wert des Kulturmediums verbunden.

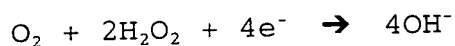
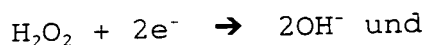
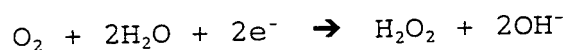
Wie in Fig. 2 besonders gut erkennbar ist, ist dicht benachbart zu den Gates 18 jeweils eine aus einem Edelmetall, wie z.B. Palladium, bestehende Arbeitselektrode 19 angeordnet, die mit dem Kulturmedium in Kontakt steht. Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 2 und 3 ist die Arbeitselektrode 19 auf der Drain 16, Source 17 und Gate 18 überdeckenden Siliziumnitrid-Schicht angeordnet und umgrenzt das Gate 18 ringförmig.

Den Arbeitselektroden 19 ist eine Referenzelektrode 20 zugeordnet, die das Kulturmedium mit Abstand zu den ISFETs 14 kontaktiert. Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 1 ist diese Referenzelektrode 19 in der Ableitung 12 für das Kulturmedium angeordnet. Zum Anlegen eines elektrischen Potentials an das Kulturmedium sind die Referenzelektrode 20 und die Arbeitselektroden 19 mit einer elektrischen Spannungsquelle verbindbar.

Mittels der vorstehend beschriebenen Meßanordnung läßt sich die Atmungsaktivität der Biokompartimente 1 indirekt messen. Dazu wird die Pumpe 11, welche den Durchfluß des Kulturmediums durch die Messkammer 3 bewirkt, vorübergehend angehalten. In Fig. 4 ist das Zeitintervall, während dem der Durchfluß in der Meßkammer 3 gestoppt ist, durch die Zeitpunkte T1 (Abschalten der Pumpe 11) und T2 (Einschalten der Pumpe 11) markiert. Dieses Zeitintervall kann beispielsweise 8 Minuten betragen.

Danach wird mittels des ISFETs 14 für den pH-Wert des Kulturmediums ein erster Meßwert pH_1 für ein erstes pH-Meßwertpaar gemessen. Dann wird in einem im Wirkungsbereich der Biokompartimente 1 befindlichen Teilbereich des Kulturmediums das elektrische Potential durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen Referenzelektrode 20 und Arbeitselektrode 19 an der Arbeitselektrode 19 soweit in den negativen Bereich abgesenkt, daß aus in dem Kulturmedium befindlichem Sauerstoff Hydroxid-Ionen gebildet werden. Dabei beträgt dieses Potential vorzugsweise etwa -700 bis -800 Millivolt. Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 3 wird dieses Potential etwa 30

Sekunden an die Elektroden 19, 20 angelegt. Die mit dem Kulturmedium in Kontakt stehende Oberfläche der Arbeitselektrode 19 wird möglichst klein gewählt und beträgt vorzugsweise weniger als $1000 \mu\text{m}^2$, um bei angelegter elektrischer Spannung den Sauerstoffverbrauch an der Arbeitselektrode 19 möglichst gering zu halten. In Fig. 4 ist das Zeitintervall, an dem das negative Potential an die Arbeitselektrode 19 angelegt wird, jeweils durch ein Doppelpfeil Pf1 markiert. Während des Anlegens des negativen elektrischen Potentials wird im Bereich der Arbeitselektrode 19 in dem Kulturmedium befindlicher Sauerstoff entsprechend den nachfolgenden Reaktionsgleichungen reduziert:



Die dabei an der Arbeitselektrode 19 gebildeten Hydroxid-Ionen bewirken in dem Kulturmedium eine lokale Veränderung des pH-Wertes, die mittels des ISFETs 14 meßbar ist. In Fig. 4 ist deutlich erkennbar, daß der pH-Wert während des Anlegens des negativen elektrischen Potentials an die Arbeitselektrode 19 um einen dem Sauerstoffgehalt des Kulturmediums entsprechenden Wert ansteigt. Da die an der Arbeitselektrode 19 gebildeten Hydroxid-Ionen von der Arbeitselektrode 19 wegdiffundieren und einen Konzentrationsgradienten bilden, wird die Arbeitselektrode 19 möglichst dicht an dem Gate 18 des ISFET 14 angeordnet, um bei der Detektion dieser Hydroxid-Ionen eine möglichst große Empfindlichkeit des ISFET 14 zu erreichen.

Bei an der Arbeitselektrode 19 anliegendem negativen Potential wird mittels des ISFET 14 ein zweiter pH-Meßwert pH_2 für das erste pH-Meßwertpaar in dem Kulturmedium gemessen. Danach wird das

elektrische Potential soweit angehoben, daß die Bildung von Hydroxid-Ionen aus dem in dem Kulturmedium befindlichen Sauerstoff unterbleibt, beispielsweise auf einen Wert zwischen Null und +800 Millivolt. In Fig. 4 ist deutlich erkennbar, daß der pH-Wert mit dem Zurücknehmen der Potentialabsenkung abnimmt.

Dann wird mittels des ISFET 14 für den pH-Wert des Kulturmediums ein erster Meßwert pH_3 für ein zweites pH-Meßwertpaar gemessen und danach wird das Potential an der Arbeitselektrode 19 erneut soweit in den negativen Bereich abgesenkt, daß aus in dem Kulturmedium befindlichem Sauerstoff Hydroxid-Ionen gebildet werden. In Fig. 4 ist deutlich der entsprechende Anstieg des Meßsignales des ISFETs erkennbar. Nun wird ein zweiter pH-Meßwert pH_4 des zweiten pH-Meßwertpaares mittels des ISFETs erfasst und danach wird das elektrische Potential soweit angehoben, daß die Bildung von Hydroxid-Ionen aus dem in dem Kulturmedium befindlichen Sauerstoff unterbleibt. Außerdem wird die Pumpe 11 wieder zugeschaltet.

Aus zeitlich zueinander benachbarten, einander zugeordneten ersten und zweiten pH-Meßwerten der beiden pH-Meßwertpaare wird jeweils ein pH-Differenzwert

$$\Delta pH_{-21} = pH_{-2} - pH_{-1}$$

$$\Delta pH_{-43} = pH_{-4} - pH_{-3},$$

gebildet der ein Maß für den Sauerstoffgehalt in dem Kulturmedium darstellt. Aus dem Unterschied ($\Delta pH_{-43} - \Delta pH_{-21}$) dieser zeitlich aufeinanderfolgenden Differenzwerte pH_{-43} , pH_{-21} und dem Abstand ΔT zwischen den Zeitpunkten, an denen die pH-Differenzwerte pH_{-43} , pH_{-21} gemessen wurden, wird die Atmungsaktivität oder Atmungsleistung

$$\frac{\Delta pH_{-43} - \Delta pH_{-21}}{\Delta T}$$

der Biokompartimente 1 bestimmt.

Zusätzlich wird aus dem Unterschied der ersten pH-Meßwerte $pH_{1,1}$, $pH_{1,3}$ die Ansäuerung

$$\Delta pH_{1,3,1} = pH_{1,3} - pH_{1,1}$$

ermittelt. Bei den in Fig. 4 bis 6 gezeigten Ausführungsbeispielen ist diese pH-Wert-Änderung negativ, d.h. die Biokompartimente säuern während der Stillstandsphase der Pumpe 11 das Kulturmedium an. In Fig. 5 und 6 ist diese Ansäuerung jeweils durch einen Geradenabschnitt 21 strichliniert dargestellt. Aus den so gewonnenen Meßwerten für Atmungsaktivität und Ansäuerung wird auf den Stoffwechsel der Biokompartimente 1 geschlossen. Entsprechend kann bei photosynthetisch aktiven Biokompartimenten 1, wie z.B. Algen, die Sauerstoffabgabe und Basifizierung gemessen werden.

Die aus dem Absenken und Anheben des elektrischen Potentials an der Arbeitselektrode 19 sowie dem Erfassen jeweils eines ersten pH-Meßwerts $pH_{1,1}$, $pH_{1,3}$ und jeweils eines zweiten pH-Meßwertes $pH_{1,2}$, $pH_{1,4}$ bestehenden Verfahrensschritte können gegebenenfalls auch mehrmals während der Stillstandsphase der Pumpe 11 wiederholt werden, wie dies bei den Ausführungsbeispielen gemäß Fig. 5 bis 7 erkennbar ist. In Fig. 5 bis 7 ist der bei dem i-ten Wiederholen dieser Verfahrensschritte ermittelte pH-Differenzwert jeweils mit $\Delta pH_{i+1,1}$ bezeichnet.

Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 5 ist das Kulturmedium im wesentlichen frei von zellbeeinflussenden Wirkstoffen. Während der durch die Zeitpunkte T1 und T2 markierten Stillstandsphase der Pumpe 11 ist eine deutliche Ansäuerung des Kulturmediums durch die Biokompartimente 1 erkennbar. Wie aus dem Unterschied der pH-Differenzwerte $\Delta pH_{1,4,3}$ und $\Delta pH_{i+1,1}$ erkennbar ist, nehmen die Biokompartimente Sauerstoff aus dem Kulturmedium auf.

Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 6 enthält das Kulturmedium Jodacetat als zellbeeinflussenden Wirkstoff. Durch einen

Vergleich mit Fig. 5 ist erkennbar, daß die durch die Biokompartimente 1 bewirkte Ansäuerung ΔpH_{31} des Kulturmediums abnimmt. Das Jodacetat hindert die Biokompartimente 1 weitestgehend daran, Wasserstoffionen an das Kulturmedium abzugeben. Im Vergleich zu
 5 Fig. 5 ist außerdem erkennbar, daß das Jodacetat eine Erhöhung der Atmungsaktivität der Biokompartimente 1 bewirkt.

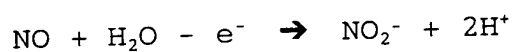
Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 7 enthält das Kulturmedium das Detergenz Triton®, das zum Absterben der Biokompartimente 1
 10 führt. Deutlich ist erkennbar, daß die Biokompartimente 1 nach dem Kontakt mit dem Triton® wegen Auflösung der mitochondrialen Atmungsketten keinerlei Atmungsaktivität mehr aufweisen und auch den pH-Wert des Kulturmediums nicht mehr beeinflussen.

15 In Fig. 5 bis 7 ist noch erkennbar, daß die Zeitpunkte für die Messung der ersten und zweiten pH-Meßwerte so auf die Zeitpunkte, an denen das elektrische Potential an der Arbeitselektrode abgesenkt oder angehoben wird, abgestimmt werden, daß die Bildungsrate der Hydroxid-Ionen zu den Meßzeitpunkten im wesentlichen der Bildungsrate
 20 der Hydroxid-Ionen im Zeitpunkt kurz vor dem Absenken oder Anheben der elektrischen Spannung entspricht. Die Hydroxid-Ionenkonzentration befindet sich somit zu den Meßzeitpunkten im wesentlichen im Fließgleichgewicht. In Fig. 5 bis 7 sind einige der ersten beziehungsweise zweiten pH-Meßwerte jeweils durch horizontale,
 25 strichpunktierte Linien markiert.

Bei dem Ausführungsbeispiel nach Figur 8 wird nach dem Abschalten der Pumpe 11 zunächst ein erster Meßwert pH_1 und ein zweiter pH_2 Meßwert für ein erstes pH-Meßwertpaar einer Stickstoffmonoxid-
 30 Konzentrationsmessung gemessen, wobei wie bei dem Ausführungsbeispiel nach Figur 3 vorgegangen wird. Danach wird die elektrische Spannung abgeschaltet. Dann wird mittels des ISFETs 14 für den pH-Wert des Kulturmediums ein erster Meßwert pH_1 für ein erstes pH-Meßwertpaar einer Stickstoffmonoxid-Konzentrationsmessung gemessen. Da das von
 35 den Biokompartimenten 1 gebildete Stickstoffmonoxid in dem

Kulturmedium nur eine geringe Halbwertszeit aufweist, ist der ISFET 14 vorzugsweise direkt an der Zellmembran oder dicht benachbart dazu angeordnet. Dann wird in dem im Wirkungsbereich der Biokompartimente 1 befindlichen Teilbereich des Kulturmediums das elektrische Potential durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen Referenzelektrode 20 und Arbeitselektrode 19 an der Arbeitselektrode 19 soweit in den positiven Bereich angehoben, daß aus dem im Kulturmedium befindlichen Stickstoffmonoxid (NO) Wasserstoff-Ionen gebildet werden. Dabei beträgt dieses Potential vorzugsweise etwa +700 bis +800 Millivolt, bezogen auf das Potential der Referenzelektrode 20. Dann wird mittels des ISFET 14 ein zweiter pH-Meßwert pH_{H_2} für das erste pH-Meßwertpaar der Stickstoffmonoxid-Konzentrationsmessung in dem Kulturmedium gemessen.

In Fig. 8 sind die Zeitintervalle, in denen die positive elektrische Spannung an die Elektroden 19, 20 angelegt wird, jeweils durch den Doppelpfeil Pf1 und die Zeitintervalle, in denen die negative elektrische Spannung an die Elektroden 19, 20 angelegt wird, jeweils durch den Doppelpfeil Pf2 markiert. Während des Anlegens des positiven elektrischen Potentials wird im Bereich der Arbeitselektrode 19 in dem Kulturmedium befindliches Stickstoffmonoxid entsprechend der Reaktionsgleichung



reduziert. Die dabei an der Arbeitselektrode 19 gebildeten Wasserstoff-Ionen bewirken in dem Kulturmedium eine lokale Veränderung des pH-Wertes, die mittels des ISFETs 14 meßbar ist. In Fig. 8 ist deutlich erkennbar, daß der pH-Wert während des Anlegens des positiven elektrischen Potentials an die Arbeitselektrode 19 um einen dem Stickstoffmonoxidgehalt des Kulturmediums entsprechenden Wert abfällt.

Dann wird die elektrische Spannung erneut abgeschaltet und es wird ein erster Meßwert pH_{H_3} für ein zweites pH-Meßwertpaar der

Sauerstoff-Konzentrationsmessung ermittelt. Danach wird das Potential an der Arbeitselektrode 19 soweit in den negativen Bereich abgesenkt, daß aus in dem Kulturmedium befindlichem Sauerstoff Hydroxid-Ionen gebildet werden. Nun wird ein zweiter pH-Meßwert pH_{-4} des zweiten
 5 pH-Meßwertpaares der Sauerstoff-Konzentrationsmessung mittels des ISFETs erfasst. Dann wird die elektrische Spannung abgeschaltet und es wird ein erster Meßwert pH_{-3} für ein zweites pH-Meßwertpaar der Stickstoffmonoxid-Konzentrationsmessung gemessen. Nachdem das elektrische Potential erneut soweit angehoben wurde, daß aus dem
 10 indemKulturmediumbefindlichenStickstoffmonoxidWasserstoff-Ionen gebildet werden, wird ein zweiter pH-Meßwert pH_{+4} des zweiten pH-Meßwertpaares der Stickstoffmonoxid-Konzentrationsmessung mittels des ISFETs erfasst und die Pumpe 11 wird wieder eingeschaltet.

15 Aus den pH-Differenzwerten

$$\Delta pH_{-21} = pH_{-2} - pH_{-1}$$

$$\Delta pH_{-43} = pH_{-4} - pH_{-3},$$

20 wird wie bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 4 die Atmung

$$\frac{\Delta pH_{-43} - \Delta pH_{-21}}{\Delta T}$$

25 der Biokompartimente 1 bestimmt. Zusätzlich wird aus den pH-Differenzwerten

$$\Delta pH_{+21} = pH_{+2} - pH_{+1}$$

$$\Delta pH_{+43} = pH_{+4} - pH_{+3},$$

30

die Konzentrationsänderung des Stickstoffmonoxids

$$\frac{\Delta pH_{+43} - \Delta pH_{+21}}{\Delta T}$$

35

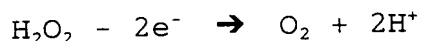
in dem Kulturmedium bestimmt.

Außerdem werden Meßwerte

$$\begin{aligned} \Delta \text{pH}_{-31} &= \text{pH}_{-3} - \text{pH}_{-1} \\ \Delta \text{pH}_{+31} &= \text{pH}_{+3} - \text{pH}_{+1} \end{aligned}$$

für die Ansäuerung gebildet.

10 In entsprechender Weise kann bei Biokompartimenten 1, die beim
Stoffwechsel Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aufnehmen und/oder abgeben,
die durch die Biokompartimente 1 verursachte Konzentrationsänderung
des Wasserstoffperoxids gemessen werden. Dabei wird während des
Anlegens des positiven elektrischen Potentials im Bereich der
15 Arbeitselektrode 19 das in dem Kulturmedium befindliche Wasserstoff-
peroxid entsprechend der Reaktionsgleichung



20 reduziert.

Erwähnt werden soll noch, daß die Zeitdauer, während der die
elektrische Spannung an die Elektroden 19, 20 angelegt ist, so
bemessen werden kann, daß die benachbart zur Arbeitselektrode 19
25 angeordneten Biokompartimente 1 durch den aufgrund der elektrischen
Spannung im Bereich der Arbeitselektrode 19 lokal veränderten pH-Wert
des Kulturmediums beeinflußt werden. Dadurch ist es beispielsweise
möglich, den Einfluß des pH-Wertes auf die Wirksamkeit eines in
dem Kulturmedium befindlichen Zellwirkstoff zu untersuchen.

30 Bei dem Verfahren zur Untersuchung von biologischen Biokompartimenten
1 wird also eine die Biokompartimente 1 enthaltende Meßkammer 2
kontinuierlich oder portionsweise von Kulturmedium durchflossen.
In einem benachbart zu den Biokompartimenten 1 befindlichen
35 Kulturmediumbereich wird eine elektrische Spannung derart angelegt,

daß aus einem in dem Kulturmedium befindlichen, von den Biokompartimenten abgebbaren und/oder aufnehmbaren Stoffes OH^- - und/oder H^+ -Ionen gebildet werden. Während des Anliegens der Spannung wird ein erster Meßwert pH_{-1} , pH_{-3} , pH_{+1} , pH_{+3} für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen. Dann wird die Spannung abgeschaltet oder derart geändert, daß die Bildung von OH^- - und H^+ -Ionen aus dem Stoff aufhört. Vor oder nach der Messung des ersten Meßwertes pH_{-1} , pH_{-3} , pH_{+1} , pH_{+3} wird bei abgeschalteter elektrischer Spannung oder bei einer Spannung, bei der die Bildung von Hydroxid- und Wasserstoff-Ionen aus dem Stoff unterbleibt, ein zweiter Meßwert pH_{-2} , pH_{-4} , pH_{+2} , pH_{+4} für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen. Nachdem die gesamte Messung wenigstens einmal wiederholt wurde, werden aus den ersten und zweiten Meßwerten die Konzentrationsänderung des Stoffs in dem Kulturmedium und die Ansäuerung oder Basifizierung des Kulturmediums bestimmt.

/Patentansprüche

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung von membranumschlossenen Biokompartimenten (1), wobei die Biokompartimente (1) in einer Mikrofließkammer (2) bereitgestellt werden, die von einem mit den Biokompartimenten (1) in Kontakt stehenden, gegebenenfalls einen die Biokompartimente (1) beeinflussenden Wirkstoff enthaltenden Kulturmedium durchflossen wird, und wobei der pH-Wert des in der Mikrofließkammer (2) befindlichen Kulturmediums gemessen wird, **dadurch gekennzeichnet**,
- a) daß die Konzentration eines von den Biokompartimenten (1) beim Stoffwechsel abgebbaren und/oder aufnehmbaren Stoffes in einem im Wirkungsbereich der Biokompartimente (1) befindlichen Teilbereich des Kulturmediums indirekt gemessen wird, indem zwischen einer in dem Teilbereich angeordneten Arbeitselektrode (19) und einer dazu beabstandeten Referenzelektrode (20) eine elektrische Spannung derart an das Kulturmedium angelegt wird, daß aus dem in dem Kulturmedium befindlichen Stoff Hydroxid-Ionen oder Wasserstoff-Ionen gebildet werden,
- b) daß an einer in dem Teilbereich des Kulturmediums befindlichen Meßstelle während des Anliegens dieser elektrischen Spannung wenigstens ein erster Meßwert (pH_{-1} , pH_{-3} bzw. pH_{+1} , pH_{+3}) für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen wird,
- c) daß anschließend die elektrische Spannung abgeschaltet oder derart geändert wird, daß die Bildung von Hydroxid- und Wasserstoff-Ionen aus dem Stoff aufhört,
- d) daß kurz vor oder nach der Messung des ersten Meßwertes (pH_{-1} , pH_{-3} bzw. pH_{+1} , pH_{+3}) bei abgeschalteter elektrischer Spannung oder bei einer Spannung, bei der die Bildung von Hydroxid- und Wasserstoff-Ionen aus dem Stoff unterbleibt, zumindest ein zweiter Meßwert (pH_{-2} , pH_{-4} bzw. pH_{+2} , pH_{+4}) für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen wird,

- e) daß aus dem ersten Meßwert (pH_{-1} , pH_{-2} bzw. pH_{+1} , pH_{+2}) und dem zweiten Meßwert (pH_{-3} , pH_{-4} bzw. pH_{+3} , pH_{+4}) die Differenz (ΔpH_{-21} , ΔpH_{-43} bzw. ΔpH_{+21} , ΔpH_{+43}) gebildet wird,
- f) daß die Schritte a) bis e) wenigstens einmal wiederholt werden,
- g) daß aus dem Unterschied zwischen wenigstens zwei dieser Meßwert-Differenzen (ΔpH_{-21} , ΔpH_{-43} bzw. ΔpH_{+21} , ΔpH_{+43}) die Konzentrationsänderung des Stoffs in dem Kulturmedium und aus dem Unterschied zwischen wenigstens zwei der ersten pH-Meßwerte (pH_{-1} , pH_{-3} bzw. pH_{+1} , pH_{+3}) und/oder zweiten pH-Meßwerte (pH_{-2} , pH_{-4} bzw. pH_{+2} , pH_{+4}) die Ansäuerung oder Basifizierung des Kulturmediums ermittelt werden
- h) und daß aus den so gewonnen Meßwerten für die Konzentrationsänderung und die Ansäuerung oder Basifizierung die Stoffwechselaktivität der Biokompartimente (1) bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Abfolge bestehend aus den Schritten a) bis g) wenigstens zweimal durchlaufen wird und daß bei diesen Durchläufen die Polarität der zwischen der Arbeitselektrode (19) und der Referenzelektrode (20) angelegten elektrischen Spannung unterschiedlich gewählt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitpunkte für die Messung der pH-Meßwerte (pH_{-1} , pH_{-2} , pH_{-3} , pH_{-4} bzw. pH_{+1} , pH_{+2} , pH_{+3} , pH_{+4}) so auf die Zeitpunkte, an denen das elektrische Potential verändert oder abgeschaltet wird, abgestimmt werden, daß sich die Wasserstoff- und Hydroxid-Ionenkonzentration in dem Kulturmedium zu den Meßzeitpunkten im wesentlichen im Gleichgewicht befindet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils der Zeitabstand zwischen dem Zeitpunkt

des Anlegens, Abschaltens oder Veränderns der elektrischen Spannung und dem darauffolgenden Zeitpunkt, in dem ein pH-Meßwert (pH_{-1} , pH_{-2} , pH_{-3} , pH_{-4} , bzw. pH_{+1} , pH_{+2} , pH_{+3} , pH_{+4}) gemessen wird, bei allen pH-Meßwerten (pH_{-1} , pH_{-2} , pH_{-3} , pH_{-4} , bzw. pH_{+1} , pH_{+2} , pH_{+3} , pH_{+4}) etwa gleich ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrische Spannung abgeschaltet oder gemäß Schritt c) geändert wird, bevor sich ein Gleichgewichtszustand der Wasserstoff- und Hydroxid-Ionenkonzentration in dem Kulturmedium ausgebildet hat.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der zwischen der Arbeitselektrode (19) und der Referenzelektrode (20) fließende elektrische Elektrodenstrom gemessen wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Biokompartimente (1) derart an der Arbeitselektrode (19) angelagert werden, daß sie diese zumindest bereichsweise überdecken, und daß aus der zwischen Arbeitselektrode (19) und Bezugselektrode (20) anliegenden elektrischen Spannung und dem Elektrodenstrom die Morphologie der Biokompartimente (1) ermittelt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Durchfluß des Kulturmediums während und zwischen der Erfassung des ersten und letzten pH-Meßwertes einer zur Bestimmung der Konzentrationsänderung des Stoffs und der Ansäuerung oder Basifizierung des Kulturmediums vorgesehenen pH-Wert-Meßreihe angehalten oder zumindest reduziert wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Erfassung des ersten und letzten

pH-Meßwertes der pH-Wert-Meßreihe die Pufferkapazität des Kulturmediums konstant gehalten wird.

/Zusammenfassung

Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Untersuchung von Biokompartimenten (1) wird eine die Biokompartimente (1) enthaltende Meßkammer (2) kontinuierlich oder portionsweise von Kulturmedium durchflossen. In einem benachbart zu den Biokompartimenten (1) befindlichen Kulturmediumbereich wird eine elektrische Spannung derart angelegt, daß aus einem in dem Kulturmedium befindlichen, von den Biokompartimenten (1) abgebbaren und/oder aufnehmbaren Stoff OH^- - und/oder H^+ -Ionen gebildet werden. Während des Anliegens der Spannung wird ein erster Meßwert (pH_{-1} , pH_{-3}) für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen. Dann wird die Spannung abgeschaltet oder derart geändert, daß die Bildung von OH^- - und H^+ -Ionen aus dem Stoff aufhört. Vor oder nach der Messung des ersten Meßwertes (pH_{-1} , pH_{-3}) wird bei abgeschalteter elektrischer Spannung oder bei einer Spannung, bei der die Bildung von Hydroxid- und Wasserstoff-Ionen aus dem Stoff unterbleibt, ein zweiter Meßwert (pH_{-2} , pH_{-4}) für den pH-Wert des Kulturmediums gemessen. Nachdem die gesamte Messung wenigstens einmal wiederholt wurde, werden aus den ersten und zweiten Meßwerten die Konzentrationsänderung des Stoffs in dem Kulturmedium und die Ansäuerung oder Basifizierung des Kulturmediums bestimmt. (Fig. 1).

Patentanwalt

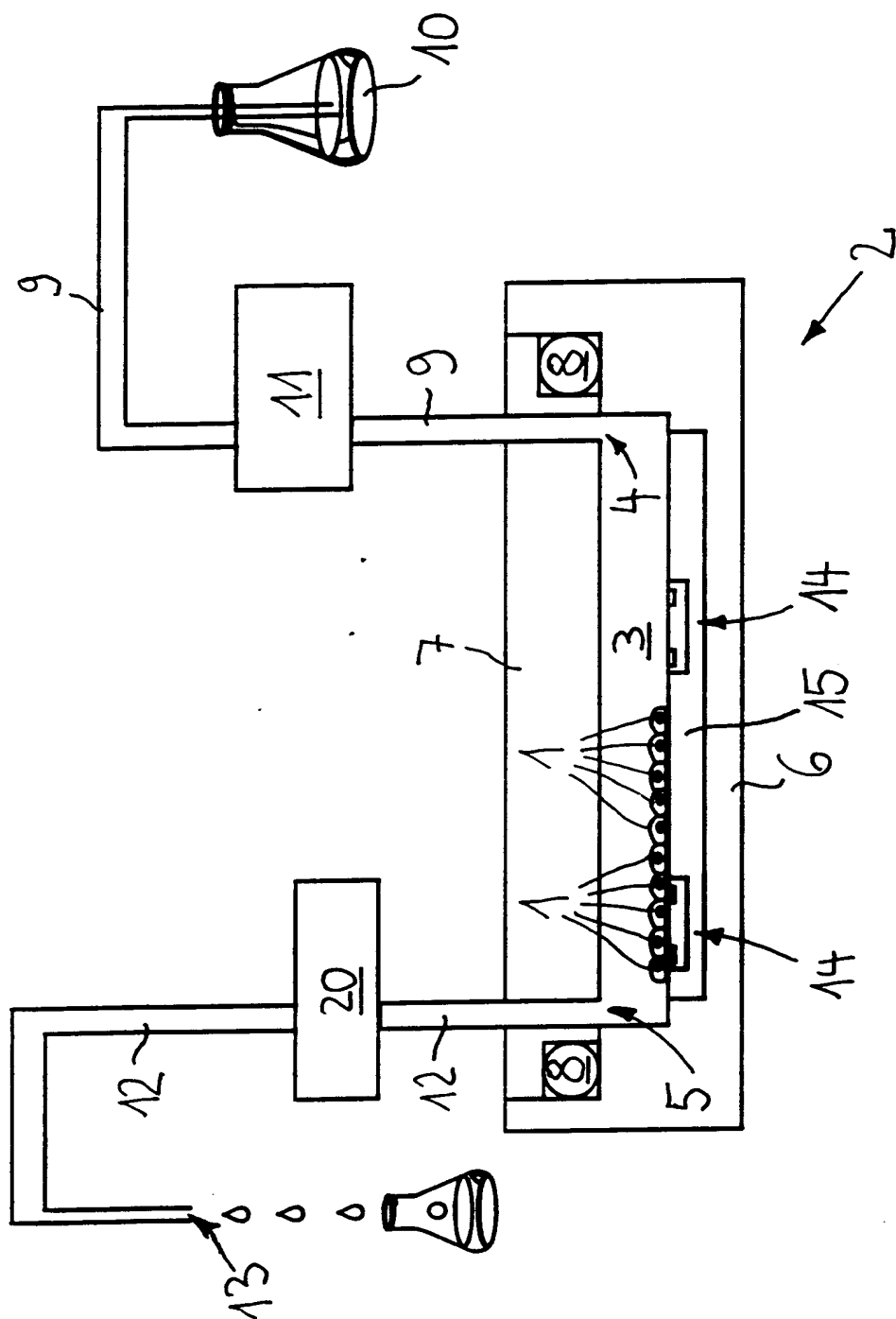


Fig. 1

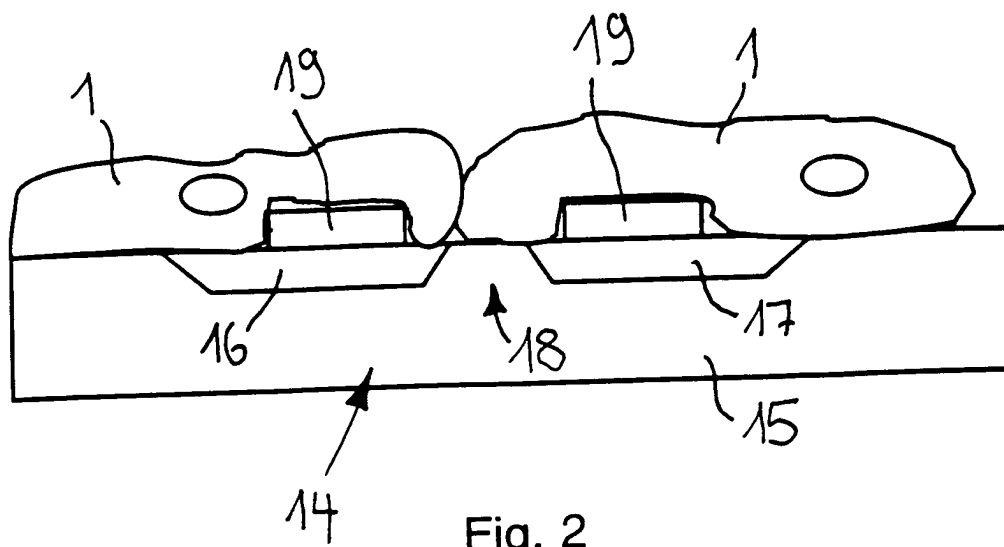


Fig. 2

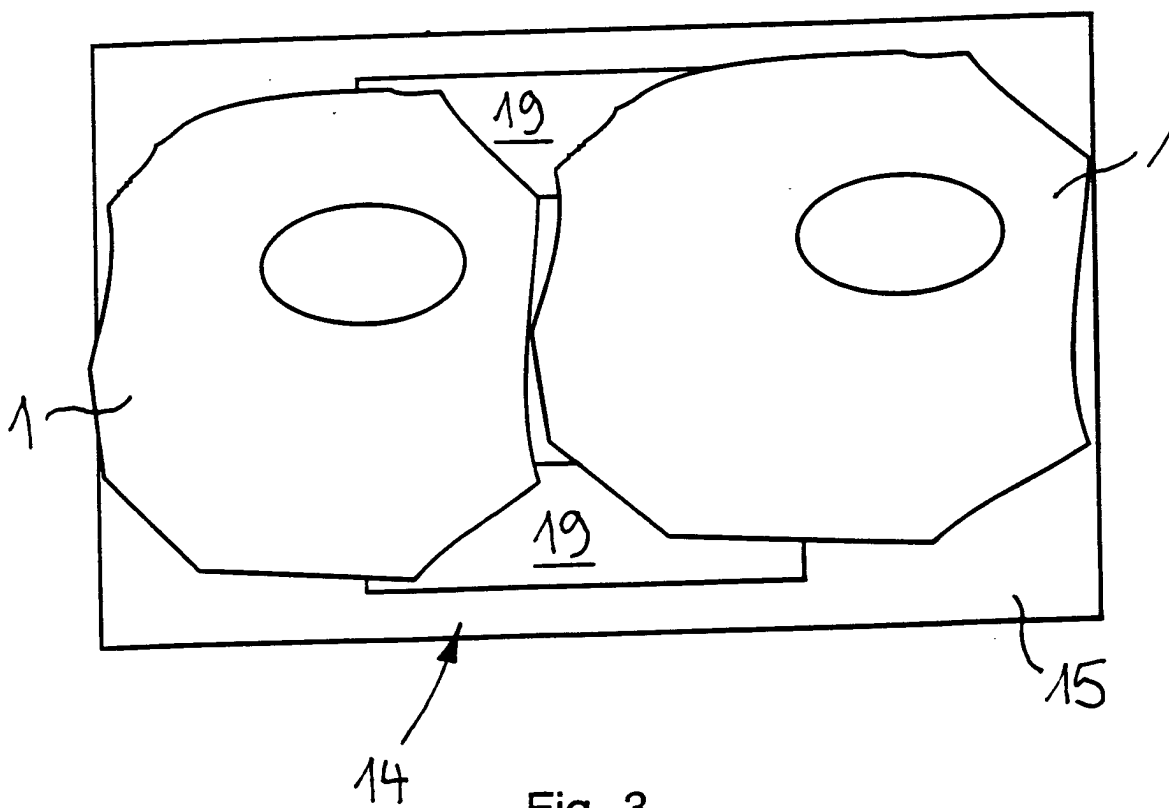


Fig. 3

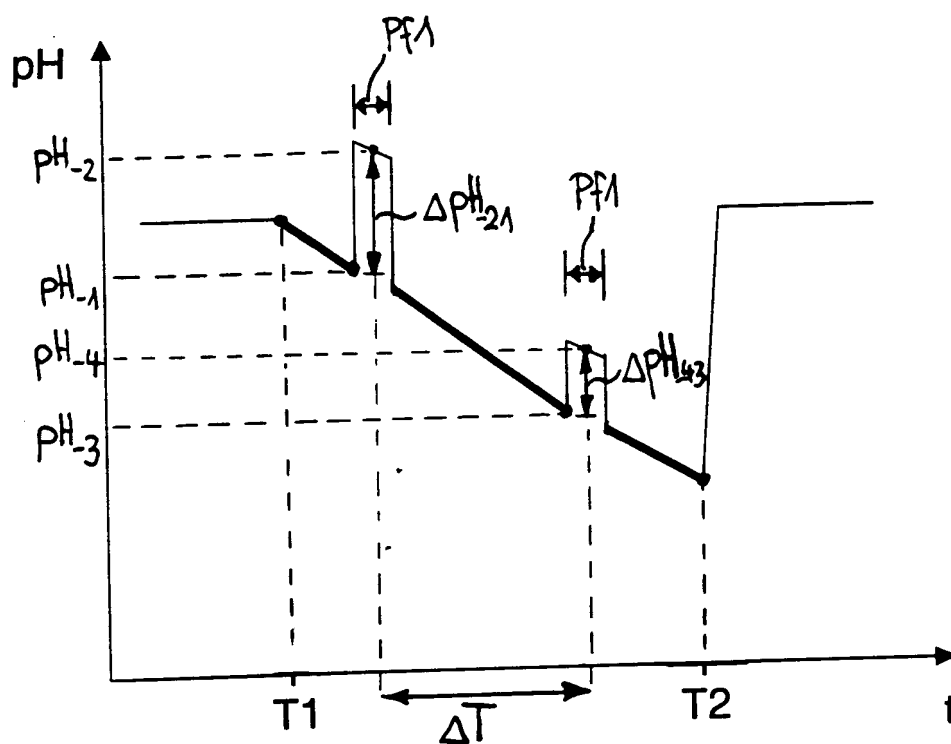


Fig. 4

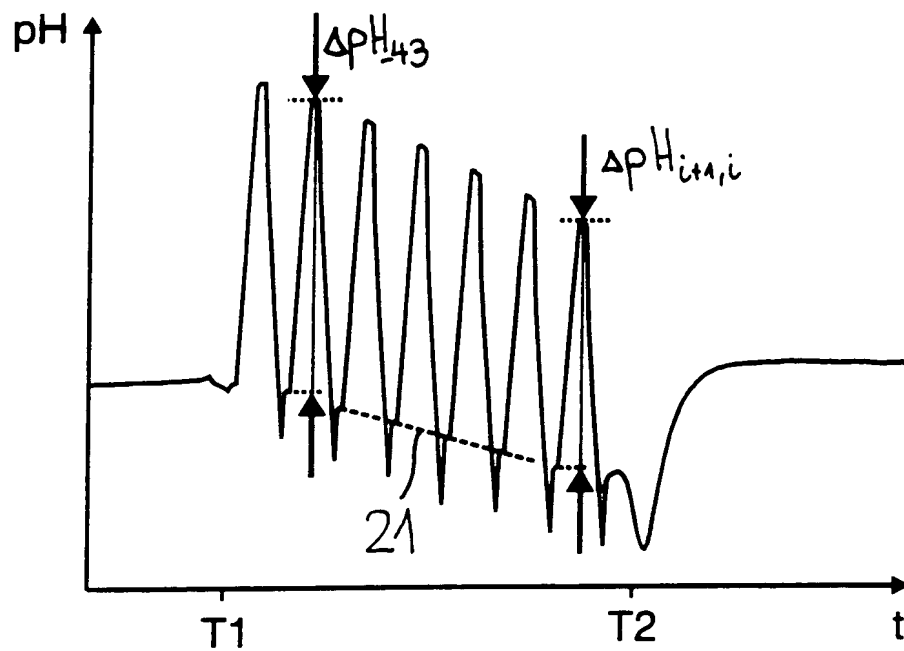


Fig. 5

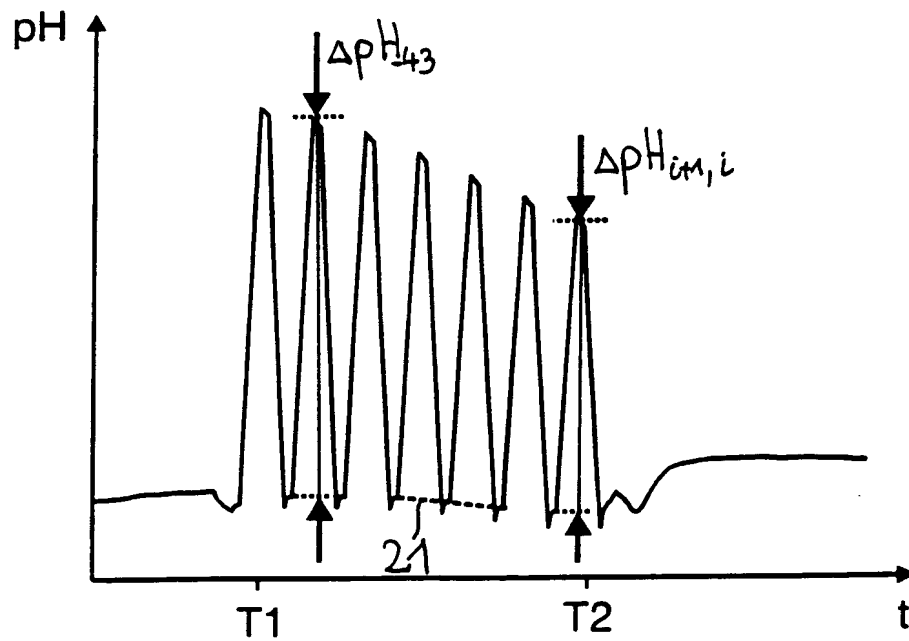


Fig. 6

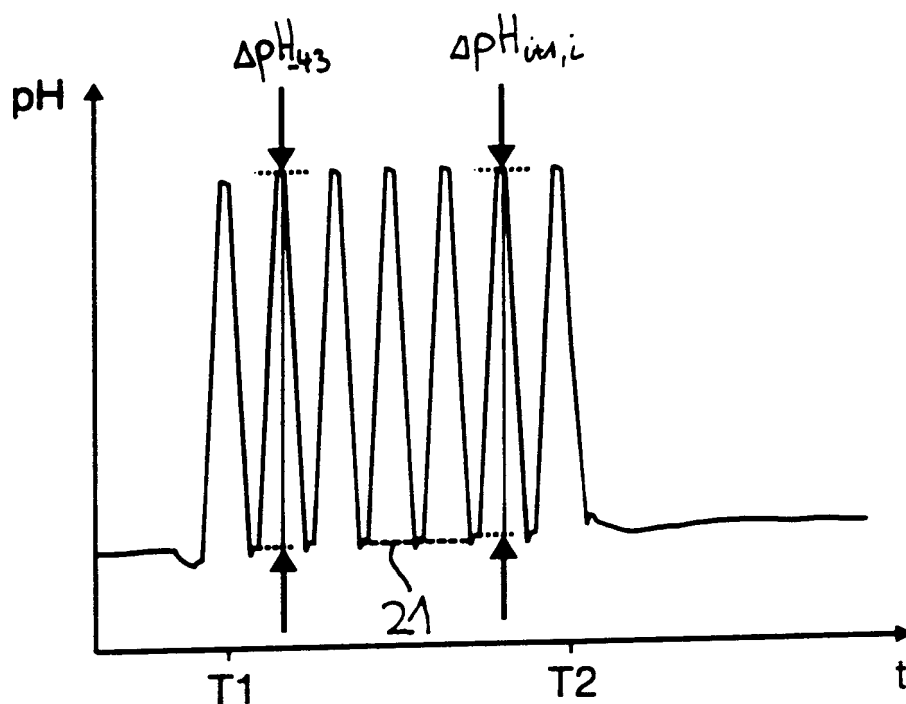


Fig. 7

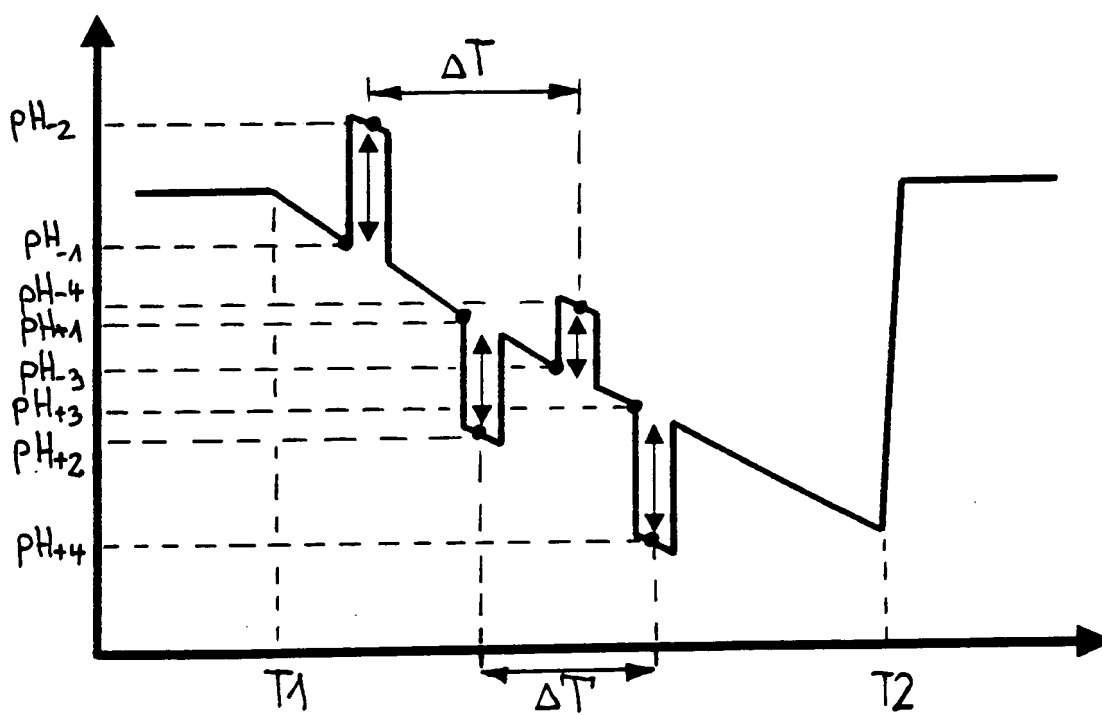


Fig. 8